

New antibacterial and antifungal peptide(s) from Podisus

Publication number: FR2733237

Publication date: 1996-10-25

Inventor: BULET PHILIPPE; HOFFMAN JULES; FEHLBAUM PASCALE; HETRU CHARLES; TCHERNYCH SERGUEY

Applicant: RHONE POULENC AGROCHIMIE (FR)

Classification:

- international: **A01N37/30; C07K14/435; A61K38/00; A01N37/30; C07K14/435; A61K38/00; (IPC1-7): C07K14/435; A01N37/46; A61K38/10; A61K38/16; C07K7/08**

- European: **A01N37/30; C07K14/435A4**

Application number: FR19950005094 19950424

Priority number(s): FR19950005094 19950424

[Report a data error here](#)

Abstract of FR2733237

Peptides of formula (I) are new: a-c-b (I) a = 0-10 amino acids; b = 0-5 amino acids and c = ILYCNRRTGLC, with the two C residues forming an intramolecular disulphide bridge. Insects of the genus Podisus (Hemiptera), pref. P. maculiventris, are exposed to at least one bacterial inducer of (I) synthesis, either a Gram positive or negative species but pref. a mixt. of both sorts. (I) synthesised are then extracted from the haemolymph or crushed insects by stirring with an acid to neutral medium (pH 2-7) and centrifuged. The supernatant is applied to a sepn. column, hydrophilic cpds. removed by washing, e.g. with trifluoroacetic acid (TFA), and hydrophobic cpds. recovered by elution, e.g. with an increasing gradient of MeCN in dil. acid. The extracted cpds. are then purified and sequenced. Chemical synthesis of (I) is also contemplated.

Data supplied from the [esp@cenet](#) database - Worldwide

① RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication : **2 733 237**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

⑫ N° d'enregistrement national : **95 05094**

⑬ Int Cl⁹ : C 07 K 14/435, 7/08, A 61 K 38/10, 38/16, A 01 N
37/46

⑫ **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

⑭ Date de dépôt : 24.04.95.

⑮ Priorité :

⑯ Date de la mise à disposition du public de la
demande : 25.10.96 Bulletin 96/43.

⑰ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑱ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑲ Demandeur(s) : RHONE POULENC AGROCHIMIE —
FR.

⑳ Inventeur(s) : BULET PHILIPPE, HOFFMAN JULES,
FEHLBAUM PASCALE, HETRU CHARLES et
TCHERNYCH SERGUEY.

㉑ Titulaire(s) :

㉒ Mandataire :

㉓ **PEPTIDE ANTIBACTERIEN ET ANTIFONGIQUE.**

㉔ 1. Peptide antibactérien et antifongique.

2. Il est de formule:

a- Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys- b

dans laquelle:

- Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys est le mail-
lon central, de taille réduite, qui comporte 2 résidus cystéi-
nes formant un pont disulfure intramoléculaire.

- a est un reste variable de séquence comprenant de 0 à
10 acides aminés,

- b est un reste variable de séquence comprenant de 0 à
5 acides aminés,

chaque groupe de trois lettres constitutif du mail-
lon central et des groupes a et b étant le symbole à trois lettres
d'un des 20 acides aminés de base.

3. Il est utilisable pour le traitement antibactérien et anti-
fongique des plantes et dans la thérapie humaine et ani-
male.

FR 2 733 237 - A1



Applicants: Peter David East and Susan
Elizabeth Brown
U.S. Serial No.: 10/590,539
Filed: as §371 national stage of
PCT/AU2005/000234
Exhibit 10



Peptide antibactérien et antifongique

5 La présente invention a pour objet un nouveau peptide ayant des propriétés antibactériennes et antifongiques, des compositions utilisables en agriculture et en thérapie humaine ou animale contenant ce peptide comme matière active. L'invention concerne également un procédé de préparation de ce peptide.

10 On sait de longue date que les insectes présentent une résistance efficace contre les bactéries et les champignons. Cette défense est pour une large part basée sur la synthèse rapide de plusieurs familles de peptides à large spectre d'activité. Cette synthèse est induite par une blessure septique ou par l'injection d'une faible dose de bactéries ou de champignons. a noter que les champignons sont l'un des pathogènes les plus fréquents chez les insectes.

15 Il a maintenant été isolé, à partir d'une induction chez l' hémiptère *Podisus sp.* de préférence *maculiventris.*, un peptide, qui présente des caractéristiques remarquables ainsi que des propriétés bactéricides et fongicides notamment contre les champignons responsables des maladies des plantes et les champignons de la pathologie humaine et animale. Au sens de l'invention on entend par propriétés antibactériennes et antifongiques
20 respectivement aussi bien les propriétés bactéricides que les propriétés bactériostatiques et aussi bien les propriétés fongicides que les propriétés fongistatiques.

Plus particulièrement un premier aspect de l'invention concerne le peptide de formule générale:

25 a- Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys- b

dans laquelle:

- Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys est le maillon central, de taille
30 réduite, qui comporte 2 résidus cystéines formant un pont disulfure intramoléculaire.

- a est un reste variable de séquence comprenant de 0 à 10 acides aminés,

- b est un reste variable de séquence comprenant de 0 à 5 acides aminés,

chaque groupe de trois lettres constitutif du maillon central et des groupes a et b étant le
symbole à trois lettres d'un des 20 acides aminés de base.

35

De préférence, lorsque "a" comprend au moins un acide aminé, celui-ci est l'un des 20 acides aminés de base et plus particulièrement choisi dans le groupe comprenant Gly, Ser, Lys, Pro et Val. De préférence, lorsque "b" comprend au



moins un acide aminé, celui-ci est l'un des 20 acides aminés de base et plus particulièrement choisi dans le groupe comprenant Gln, Arg et Met.

Ce peptide est appelé dans la suite "thanatine".

5 Un autre aspect de l'invention concerne un procédé pour l'obtention et l'isolement du peptide ci-dessus, qui est caractérisé en ce que successivement:

- a) on fait agir sur des *Podisus sp* de préférence *maculiventris* au moins un inducteur bactérien de la synthèse biologique de la molécule;
- b) on effectue l'extraction par mise en contact d'un broyat de *Podisus* obtenues
10 précédemment avec un milieu acide sous agitation, puis par centrifugation;
- c) on fractionne le surnageant avec séparation par lavage des molécules hydrophiles et élution des molécules hydrophobes par des éléments appropriés sur colonne séparatrice
- d) on purifie les extraits.
- e) on caractérise le peptide.

15

La première étape (induction bactérienne), est réalisée par simple agression physique telle qu'une blessure par exemple une piqûre, ou bien, et de préférence, à partir de *Podisus sp.sp* de préférence *maculiventris* adultes en les anesthésiant à l'aide d'un gaz anesthésiant, par exemple du gaz carbonique ou tout gaz ayant des effets similaires, et en
20 les immunisant par piqûre thoracique à l'aide d'une aiguille de préférence plongée avant chaque inoculation dans une suspension bactérienne. De préférence, l'inoculation est effectuée avec au moins une bactérie choisie dans le groupe comprenant les bactéries (Gram positif) et les bactéries (Gram négatif). Comme exemple représentatif préféré de bactérie (Gram positif), on peut citer *Micrococcus luteus*. Comme exemple représentatif
25 préféré de bactérie (Gram négatif), on peut citer *Escherichia coli*. De manière plus préférée on peut utiliser simultanément au moins une bactérie choisie dans le groupe comprenant les bactéries (Gram positif) et au moins une bactérie choisie dans le groupe comprenant les bactéries (Gram négatif).

De manière préférée la seconde étape (extraction) on met en contact le broyat de
30 *Podisus* ou l'hémolymph de *Podisus* avec un milieu acide constitué d'une solution acide d'un acide ou neutre (de pH de 2 à 7). La solution peut être une solution d'un acide minéral ou organique comme par exemple d'acide trifluoroacétique. L'extrait obtenu est ensuite centrifugé à froid à une vitesse de 5000 à 20000 tpm, pendant 15 à 60 mn.

De manière préférée la troisième étape (fractionnement), le lavage des molécules
35 solubles dans l'eau est effectué avec une solution acide diluée et l'élution des molécules hydrophobes avec un éluant approprié. On obtient de bons résultats avec de l'acide trifluoroacétique pour le lavage et un éluant contenant des quantités croissantes d'acétonitrile en solution acide diluée.



De manière préférée la quatrième étape (purification) est effectuée avec un éluant convenable qui peut être différent ou identique à celui de la phase précédente.

- De manière préférée, dans la dernière étape (caractérisation), la nature du peptide est analysée selon la méthode de séquençage par dégradation d'Edman (Acta Chemica Scandinavica 10 (1956) p; 761-768). Selon cette méthode on obtient par exemple la structure suivante:

Gly Ser Lys Lys Pro Val Pro - Ile Ile Tyr X Asn Arg Arg Thr Gly Lys Xs - Gln Arg Met

10

dans laquelle X est un chaînon non identifiable. La molécule a alors été soumise à une réduction suivie d'une alkylation pour ensuite soumettre la molécule au séquençage par la dégradation d'Edman. On a obtenu la séquence suivante:

- 15 Gly Ser Lys Lys Pro Val Pro - Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys - Gln Arg Met

composé G21M (composé 1)

- 20 La masse mesurée de la thanatine est de 2431 ± 1 Da. Or la masse calculée sur la base des données de séquences est de 2434 Da; il y a donc un défaut de masse, qui en tenant compte de l'incertitude sur la mesure, correspond à la formation d'un pont dissulfure intramoléculaire.

De la même manière on a caractérisé les thanatines suivantes:

- 25 - Lys Pro Val Pro - Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys - Gln Arg Met: composé K18M (composé 3)

- Val Pro - Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys - Gln Arg Met: composé V16M (composé 4)

30

- Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys - Gln Arg Met: composé I14M (composé 5)

- 35 - Gly Ser Lys Lys Pro Val Pro - Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys - Gln Arg : composé G20R (composé 6)

- Gly Ser Lys Lys Pro Val Pro - Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys - Gln: composé G19Q (composé 7)



- Gly Ser Lys Lys Pro Val Pro - Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys - :
composé G18C (native) (composé 8)

5 L'invention concerne ce peptide sous forme de ses isomères optiques L et D, seuls ou en combinaison. La forme L est celle qu'on trouve à l'état natif.

Selon un autre aspect l'invention a pour objet un procédé pour l'obtention du peptide ci-dessus, qui est caractérisé en ce qu'on procède par synthèse chimique BOC ou FMOC , à partir des formes L ou D des acides aminés de base selon la forme du dérivé
10 final recherchée, (J. Am. Chem. Soc 85 (1963), 2149-2154 et Tetrahedron Letters 32 (1979), 3041-3042) suivie d'une renaturation (reformation du pont cystéine) dans une solution à 100mM d'acétate d'ammonium à pH 8,5 pendant 24 h sous agitation à température ambiante. La thanatine ainsi obtenue présente les mêmes propriétés chromatographiques que la molécule native. Le dérivé D correspondant est obtenu selon les
15 mêmes méthodes à partir des dérivés D des acide aminés correspondants (composé 2).

Selon un autre aspect l'invention a pour objet une composition antibactérienne et/ou antifongique utilisable pour la protection des plantes contre les maladies bactériennes et les maladies fongiques.

20 Selon un autre aspect l'invention a pour objet un procédé de protection des plantes contre les maladies fongiques, caractérisé en ce qu'on applique le peptide sur les plantes.

Selon un autre aspect l'invention a pour objet une composition antibactérienne et antifongique utilisable pour la lutte contre les maladies fongiques de l'homme et des animaux. En effet la thanatine présente une activité antibactérienne contre toute une variété
25 de germes à Gram négatif et à Gram positif, aussi bien en milieu de culture riche (LB) qu'en milieu pauvre (PB). Elle provoque en outre l'agrégation des bactéries. Par ailleurs la thanatine ne présente aucun effet lytique sur des hématies de porc.

30 Les exemples suivants illustrent l'obtention et les propriétés antibactériennes et antifongiques du peptide et des compositions selon l'invention.

Exemple 1: Isolement et caractérisation du peptide

on procède selon les étapes suivantes:

- induction naturelle de la synthèse biologique :

35 Des *Podisus maculiventris* sont immunisées par piqure au niveau thoracique à proximité de l'insertion alaire à l'aide d'une fine aiguille plongée avant chaque inoculation dans une suspension bactérienne d'*Escherischia coli* 1106 (Gram négatif) tué à la chaleur pendant 2 mn à 100°C. Les insectes sont conservés à 20°C durant 24 heures.



- extraction et de purification :

L'hémolymph (1,2ml) est prélevée par incision de la cuticule. Elle est transférée dans un tube maintenu au froid en présence d'un inhibiteur de protéases (aprotinine) puis centrifugée à 2000 G (10.000 tpm) pendant 25 minutes à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu est immédiatement soumis aux différentes étapes de la purification.

Fractionnement de l'extrait sur cartouches Sep-Pak C18

Après dépôt de l'extrait sur des cartouches Sep-Pak C18, les molécules à caractère hydrophile sont éliminées par un simple lavage par 5 ml d'eau acidifiée (TFA= acide trifluoacétique) 0,05%).

L'élution des molécules hydrophobes est réalisée avec des solutions à 20, 50 et 80% d'acétonitrile en eau acidifiée (TFA 0,05%, 5 ml par cartouche).

Les fractions recueillies sont dénommées "Elution 20%", "Elution 50%" et "Elution 80%" et concentrées sous vide. Les fractions sont ensuite reconstituées avec de l'eau qualité HPLC avant l'analyse en HPLC.

Purification par HPLC des molécules à activité antibactérienne et/ou antifongique

première étape:

Les fractions "Elution 20%" et "Elution 50%" sont analysées séparément sur deux colonnes de tamisage moléculaire montées en série (SEC 2000 + SEC 3000, Beckman) sous 30% d'acétonitrile en présence de TFA 0,05% à un débit de 0,5 ml/mn.

Les fractions ayant une activité antibactérienne et/ou antifongique sont ensuite purifiées en chromatographie de phase inverse en HPLC.

purification finale: deux étapes sont nécessaires pour la purification des molécules antibactériennes et antifongiques.

- a) Les fractions présentant cette activité ont été dans un premier temps purifiées sur une colonne de phase inverse Aquapore OD 300 C18 avec un gradient linéaire d'acétonitrile de 2 à 52% dans l'eau acidifiée (TFA à 0,05%) en 90 minutes (soit une augmentation de 0,44% d'acétonitrile par minute) pour un débit de 1 ml/min.

- b) la fraction résultante de a) est ensuite purifiée sur une colonne Aquapore OD300C18.

L'élution est réalisée dans un gradient linéaire biphasique d'acétonitrile de 2 à 17% dans l'eau acidifiée (TFA 0,05%) en 10 minutes et de 17 à 27% en 45 min à un débit de 1 ml/min. Le composé 1 est obtenu pour un pourcentage de 18,6% d'acétonitrile.

La pureté de la fraction active est contrôlée par électrophorèse capillaire avant la détermination de la séquence par dégradation d'Edman et analyse en spectrométrie de masse.



Exemple 2: Test in vitro: Mesure de l'activité antibactérien et antifongique par microspectrophotométrie

Les spores des champignons à tester (à une concentration finale de 10^4 spores/ml) sont mises en suspension dans un milieu de culture contenant du bouillon de pomme de terre (Potato Dextrose Broth, DIFCO) à 1/2 force ionique (12g/l). Deux antibiotiques sont rajoutés au milieu de culture: la tétracycline (10µg/ml) et du claforan (100µg/ml). On dépose 20 µl de chaque fraction contenant la thanatine à analyser dans des plaques de microtitration en présence de 80 µl de milieu de culture contenant les spores. Au bout de 24 heures d'incubation à 25°C dans l'obscurité, on observe sous microscope la croissance des champignons. Au bout de 48 heures on évalue la croissance par mesure de l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un lecteur de plaques ELISA.

Dans ces conditions on observe une inhibition totale (sans sels de calcium), à une concentration (C.I. 100) en µM, indiquée dans les deux tableaux 1 et 2 suivants concernant le premier l'activité fongicide, l'autre l'activité bactéricide des composés 1 à 8:

Tableau 1

| | composés | | | | | | | |
|------------------------------|----------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| champignons | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | 40 | 40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 |
| <i>Neurospora crassa</i> | 2 | 2 | 5 | 20 | 40 | 10 | 20 | 20 |
| <i>Botrytis cinerea</i> | 3 | 5 | 3 | 20 | >40 | 10 | 10 | 10 |
| <i>Nectria haematococca</i> | 3 | 3 | 10 | 10 | >40 | 5 | 10 | 10 |
| <i>Trichoderma viride</i> | 3 | 3 | 5 | 40 | >40 | 20 | 20 | 40 |
| <i>Alternaria brassicola</i> | 5 | 5 | 5 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| <i>Fusarium culmorum</i> | 5 | 1 | 10 | 20 | 40 | 20 | 20 | 20 |
| <i>Ascochyta pisi</i> | 10 | 3 | 20 | 40 | >40 | 20 | 40 | 40 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 20 | 10 | 40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 |



Tableau 2

| | composés | | | | | | | |
|---------------------------------|----------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| bactéries | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| <i>Aerococcus viridens</i> | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 5 | 5 | 5 |
| <i>Micrococcus luteus</i> | 3 | 5 | 3 | 5 | 10 | 5 | 10 | 10 |
| <i>Bacillus megaterium</i> | 5 | 2 | 5 | 10 | 20 | 5 | 10 | 10 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 5 | 40 | 40 | 40 | >40 | 40 | >40 | >40 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 |
| <i>Pediococcus acidolactici</i> | 40 | 800 | 40 | 40 | >40 | 40 | 40 | 40 |
| <i>E.coli</i> D22 | 1 | 40 | 1 | 2 | 40 | 40 | >40 | >40 |
| <i>E.coli</i> D31 | 1 | 40 | 1 | 2 | 40 | 40 | >40 | >40 |
| <i>E.coli</i> 1106 | 2 | 800 | 2 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | 2 | 800 | 3 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 2 | >800 | 3 | 5 | 40 | >40 | >40 | >40 |
| <i>Enterobacter chlocae</i> | 3 | >800 | 3 | 10 | 40 | >40 | >40 | >40 |
| <i>Erwina carotovora</i> | 20 | | 40 | 40 | 40 | >40 | >40 | >40 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 40 | 800 | 40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 |

- 5 Ces résultats montrent l'excellente activité antibactérienne et antifongique du peptide selon l'invention, activité qui est au niveau des meilleurs peptides connus.

Exemple 3: test in vitro d'agrégation des bactéries

- 10 A une suspension de bactéries Gram négatif (*E.coli*) ou Gram positif (*M.luteus*), on ajoute de la thanatine(composé 1) à une concentration de 25µM. On observe la formation d'agrégats de bactéries. Ce phénomène disparaît par addition de Ca^{++} (1mM) et l'agrégation est à nouveau observée si on ajoute de l'EDTA (1mM).

- 15 Les résultats obtenus avec le composé 1 sont consignés dans le tableau 3, dans lequel CMI signifie concentration minimum d'inhibition à 100%.



Tableau 3

| Bactérie | Type Gram +/- | CMI (LB) μ M | CMI (PB) μ M | mode d'action |
|---------------------------------------|------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| <i>Salmonella typhimurium</i> | - | 5 | 2,4 | bactériostatique |
| <i>Enterobacter cloaca</i> β 12 | - | 0,6 | 2,4 | bactériolytique |
| <i>Escherichia coli</i> D31 | - | 20 | 0,6 | bactériolytique |
| <i>Escherichia coli</i> D22 | - | 10 | 0,6 | bactériolytique |
| <i>Escherichia coli</i> 1106 | - | 20 | 1,2 | bactériolytique |
| <i>Klebsellia pneumoniae</i> | - | 5 | 2,4 | bactériolytique |
| <i>Erwinia carotovora</i> | - | 10 | 20 | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | - | 40 | 40 | - |
| <i>Xanthomonas campestris</i> | - | 10 | - | bactériolytique |
| <i>Micrococcus luteus</i> | + | 10 | 2,4 | bactériolytique |
| <i>Bacillus megaterium</i> | + | - | 20 | - |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | + | 10 | 40 | - |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | + | 10 | - | - |
| <i>Bacillus subtilis</i> | + | 10 | 20 | bactériolytique |
| <i>Aerococcus viridans</i> | + | 10 | 0,6 | bactériolytique |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> | + | 20 | - | bactériostatique |

5

Exemple 4: Test in vitro: Mesure de l'activité hémolytique par microspectrophotométrie

Des suspensions d'hématies de porc (1%, 0,5% et 0,1% dans 100 μ l) sont déposées dans des puits de plaques de microtitration en présence de 80 μ l de la fraction à tester. Après incubation pendant une heure à 37°C, la plaque est centrifugée et la lyse des

10 hématis est mise en évidence par mesure de l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un lecteur de plaques ELISA. Les résultats montrent que la thanatine (composé n° 1) n'exerce aucune action lytique sur la membrane des hématies de porc. En particulier on n'observe pas d'hémolyse aussi bien dans le témoin tampon qu'avec la thanatine, même à une

15 concentration de 100 μ M, alors que dans le même test du Triton X100 à une concentration de 0,01% provoque l'hémolyse des cellules sanguines.

L'invention concerne donc également un procédé de traitement des plantes cultivées atteintes ou susceptibles d'être atteintes par les maladies fongiques, caractérisé en ce que l'on applique sur les parties aériennes de ces plantes une dose efficace d'un composé selon



l'invention. Par dose efficace, on entend une quantité suffisante pour permettre le contrôle et la destruction des champignons présents sur ces plantes cultivées. Les doses d'utilisation peuvent toutefois varier dans de larges limites selon le champignon à combattre, le type de culture, les conditions climatiques, et selon le composé utilisé.

5 En pratique, les composés s'appliquent avantageusement à des doses de 0,002 à 5 kg/ha, et de préférence de 0,005 à 1 kg/ha.

Par maladies fongiques, on entend les maladies causées par les champignons phytopathogènes, notamment ceux de la famille des ascomycètes, adélomycètes.

10 Parmi les cultures pouvant faire l'objet d'un traitement antibactérien et antifongique à l'aide d'un composé selon l'invention, on peut citer le riz, les céréales, notamment le blé et l'orge, ainsi que les plantes arboricoles, fruitières, légumières.

La présente invention a également pour objet des compositions, utilisables comme agents antibactériens et antifongiques, contenant comme matière(s) active(s) un (ou
15 plusieurs) composé selon l'invention tel que décrit précédemment, en mélange avec les supports solides ou liquides, acceptables en agriculture et les agents tensio-actifs également acceptables en agriculture. En particulier sont utilisables les supports inertes et usuels et les agents tensio-actifs usuels. Ces compositions recouvrent non seulement les compositions
20 prêtes à être appliquées sur la culture à traiter au moyen d'un dispositif adapté, tel qu'un dispositif de pulvérisation, mais également les compositions concentrées commerciales qui doivent être diluées avant application sur la culture.

Ces compositions peuvent contenir aussi toute sorte d'autres ingrédients tels que, par exemple, des colloïdes protecteurs, des adhésifs, des épaississants, des agents
25 thixotropes, des agents de pénétration, des stabilisants, des séquestrants, etc... Plus généralement les composés utilisés dans l'invention peuvent être combinés à tous les additifs solides ou liquides correspondant aux techniques habituelles de la mise en formulation.

D'une façon générale, les compositions selon l'invention contiennent
30 habituellement de 0,05 à 95 % environ (en poids) d'un composé selon l'invention (appelé par la suite matière active), un ou plusieurs supports solides ou liquides et, éventuellement, un ou plusieurs agents tensioactifs.

Par le terme "support", dans le présent exposé, on désigne une matière organique ou minérale, naturelle ou synthétique, avec laquelle le composé est combiné pour faciliter son application sur la plante, sur des graines ou sur le sol. Ce support est donc
35 généralement inerte et il doit être acceptable en agriculture, notamment sur la plante traitée. Le support peut être solide (argiles, silicates naturels ou synthétiques, silice, résines, cires, engrais solides, etc...) ou liquide (eau, alcools, notamment le butanol etc...).



L'agent tensioactif peut être un agent émulsionnant, dispersant ou mouillant de type ionique ou non ionique ou un mélange de tels agents tensioactifs. On peut citer par exemple des sels d'acides polyacryliques, des sels d'acides lignosulfoniques, des sels d'acides phénolsulfoniques ou naphthalènesulfoniques, des polycondensats d'oxyde d'éthylène sur des alcools gras ou sur des acides gras ou sur des amines grasses, des phénols substitués (notamment des alkylphénols ou des arylphénols), des sels d'esters d'acides sulfosucciniques, des dérivés de la taurine (notamment des alkyltaurates), des esters phosphoriques d'alcools ou de phénols polyoxyéthylés, des esters d'acides gras et de polyols, les dérivés à fonction sulfates, sulfonates et phosphates des composés précédents.

5 La présence d'au moins un agent tensioactif est généralement indispensable lorsque le composé et/ou le support inerte ne sont pas solubles dans l'eau et que l'agent vecteur de l'application est l'eau.

Ainsi donc, les compositions à usage agricole selon l'invention peuvent contenir les matières actives selon l'invention dans de très larges limites, allant de 0,05 % à 95 % (en poids). Leur teneur en agent tensio-actif est avantageusement comprise entre 5 % et 40 % en poids.

Ces compositions selon l'invention sont elles-mêmes sous des formes assez diverses, solides ou liquides.

Comme formes de compositions solides, on peut citer les poudres pour poudrage (à teneur en composé pouvant aller jusqu'à 100 %) et les granulés, notamment ceux obtenus par extrusion, par compactage, par imprégnation d'un support granulé, par granulation à partir d'une poudre (la teneur en composé dans ces granulés étant entre 0,5 et 80 % pour ces derniers cas), les comprimés ou tablettes effervescentes.

Le peptide selon l'invention peuvent encore être utilisés sous forme de poudres pour poudrage ; on peut aussi utiliser une composition comprenant 50 g de matière active et 950 g de talc ; on peut aussi utiliser une composition comprenant 20 g de matière active, 10 g de silice finement divisée et 970 g de talc ; on mélange et broie ces constituants et on applique le mélange par poudrage.

Comme formes de compositions liquides ou destinées à constituer des compositions liquides lors de l'application, on peut citer les solutions, en particulier les concentrés solubles dans l'eau, les concentrés émulsionnables, les émulsions, les suspensions concentrées, les aérosols, les poudres mouillables (ou poudre à pulvériser), les pâtes, les gels.

Les concentrés émulsionnables ou solubles comprennent le plus souvent 10 à 80 % de matière active, les émulsions ou solutions prêtes à l'application contenant, quant à elles, 0,001 à 20 % de matière active.



En plus du solvant, les concentrés émulsionnables peuvent contenir quand c'est nécessaire, 2 à 20 % d'additifs appropriés comme les stabilisants, les agents tensio-actifs, les agents de pénétration, les inhibiteurs de corrosion, les colorants ou les adhésifs précédemment cités.

- 5 A partir de ces concentrés, on peut obtenir par dilution avec de l'eau des émulsions de toute concentration désirée, qui conviennent particulièrement à l'application sur les cultures.

A titre d'exemple, voici la composition de quelques concentrés émulsionnables :

10 **Exemple CE 1 :**

| | |
|---|----------------|
| - matière active | 400 g/l |
| - dodécylbenzène sulfonate alcalin | 24 g/l |
| - nonylphénol oxyéthylé à 10 molécules d'oxyde d'éthylène | 16 g/l |
| 15 - cyclohexanone | 200 g/l |
| - solvant aromatique | q.s.p. 1 litre |

Selon une autre formule de concentré émulsionnable, on utilise :

20 **Exemple CE 2**

| | |
|---|-------|
| - matière active | 250 g |
| - huile végétale époxydée | 25 g |
| - mélange de sulfonate d'alcoylaryle et d'éther de polyglycol et d'alcools gras | 100 g |
| 25 - diméthylformamide | 50 g |
| - xylène | 575 g |

- Les suspensions concentrées, également applicables en pulvérisation, sont préparées de manière à obtenir un produit fluide stable ne se déposant pas et elles
 30 contiennent habituellement de 10 à 75 % de matière active, de 0,5 à 15 % d'agents tensioactifs, de 0,1 à 10 % d'agents thixotropes, de 0 à 10 % d'additifs appropriés, comme des anti-mousses, des inhibiteurs de corrosion, des stabilisants, des agents de pénétration et des adhésifs et, comme support, de l'eau ou un liquide organique dans lequel la matière active est peu ou pas soluble : certaines matières solides organiques ou des sels minéraux
 35 peuvent être dissous dans le support pour aider à empêcher la sédimentation ou comme antigels pour l'eau.

A titre d'exemple, voici une composition de suspension concentrée :



Exemple SC 1 :

| | | |
|----|---|---------|
| | - matière active | 500 g |
| | - phosphate de tristyrylphénol polyéthoxylé | 50 g |
| 5 | - alkylphénol polyéthoxylé | 50 g |
| | - polycarboxylate de sodium | 20 g |
| | - éthylène glycol | 50 g |
| | - huile organopolysiloxanique (antimousse) | 1 g |
| | - polysaccharide | 1,5 g |
| 10 | - eau | 316,5 g |

Les poudres mouillables (ou poudre à pulvériser) sont habituellement préparées de manière qu'elles contiennent 20 à 95 % de matière active, et elles contiennent habituellement, en plus du support solide, de 0 à 30 % d'un agent mouillant, de 3 à 20 % d'un agent dispersant, et, quand c'est nécessaire, de 0,1 à 10 % d'un ou plusieurs stabilisants et/ou autres additifs, comme des agents de pénétration, des adhésifs, ou des agents antimottants, colorants, etc...

Pour obtenir les poudres à pulvériser ou poudres mouillables, on mélange intimement les matières actives dans les mélangeurs appropriés avec les substances additionnelles et on broie avec des moulins ou autres broyeurs appropriés. On obtient par là des poudres à pulvériser dont la mouillabilité et la mise en suspension sont avantageuses ; on peut les mettre en suspension avec de l'eau à toute concentration désirée et ces suspensions sont utilisables très avantageusement en particulier pour l'application sur les feuilles des végétaux.

A la place des poudres mouillables, on peut réaliser des pâtes. Les conditions et modalités de réalisation et d'utilisation de ces pâtes sont semblables à celles des poudres mouillables ou poudres à pulvériser.

A titre d'exemple, voici diverses compositions de poudres mouillables (ou poudres à pulvériser) :

30

Exemple PM 1

| | | |
|----|---|-------|
| | - matière active | 50% |
| | - alcool gras éthoxylé (agent mouillant) | 2,5% |
| | - phényléthylphénol éthoxylé (agent dispersant) | 5% |
| 35 | - craie (support inerte) | 42,5% |

Exemple PM 2 :

| | | |
|--|------------------|-----|
| | - matière active | 10% |
|--|------------------|-----|



- alcool synthétique oxo de type ramifié, en C13 éthoxylé par 8 à 10 oxyde d'éthylène (agent mouillant) 0,75%
- 5 - lignosulfonate de calcium neutre (agent dispersant) 12%
- carbonate de calcium (charge inerte) q.s.p. 100 %

Exemple PM 3 :

10 Cette poudre mouillable contient les mêmes ingrédients que dans l'exemple précédent, dans les proportions ci-après :

- matière active 75%
- agent mouillant 1,50%
- agent dispersant 8%
- 15 - carbonate de calcium (charge inerte) q.s.p. 100%

Exemple PM 4 :

- matière active 90%
- alcool gras éthoxylé (agent mouillant) 4%
- 20 - phényléthylphénol éthoxylé (agent dispersant) 6%

Exemple PM 5 :

- matière active 50%
- mélange de tensio-actifs anioniques et non ioniques (agent mouillant) 2,5%
- 25 - lignosulfonate de sodium (agent dispersant) 5%
- argile kaolinique (support inerte) 42,5%

30 Les dispersions et émulsions aqueuses, par exemple les compositions obtenues en diluant à l'aide d'eau une poudre mouillable ou un concentré émulsionnable selon l'invention, sont comprises dans le cadre général de la présente invention. Les émulsions peuvent être du type eau-dans-l'huile ou huile-dans-l'eau et elles peuvent avoir une consistance épaisse comme celle d'une "mayonnaise".

Les composés selon l'invention peuvent être formulés sous la forme de granulés dispersibles dans l'eau également compris dans le cadre de l'invention.

35 Ces granulés dispersibles, de densité apparente généralement comprise entre environ 0,3 et 0,6 ont une dimension de particules généralement comprise entre environ 150 et 2000 et de préférence entre 300 et 1500 microns.



La teneur en matière active de ces granulés est généralement comprise entre environ 1 % et 90 %, et de préférence entre 25 % et 90 %.

Le reste du granulé est essentiellement composé d'une charge solide et éventuellement d'adjuvants tensio-actifs conférant au granulé des propriétés de dispersibilité dans l'eau. Ces granulés peuvent être essentiellement de deux types distincts selon que la charge retenue est soluble ou non dans l'eau. Lorsque la charge est hydrosoluble, elle peut être minérale ou, de préférence, organique. On a obtenu d'excellents résultats avec l'urée. Dans le cas d'une charge insoluble, celle-ci est de préférence minérale, comme par exemple le kaolin ou la bentonite. Elle est alors avantageusement accompagnée d'agents tensio-actifs (à raison de 2 à 20 % en poids du granulé) dont plus de la moitié est, par exemple, constituée par au moins un agent dispersant, essentiellement anionique, tel qu'un polynaphtalène sulfonate alcalin ou alcalino terreux ou un lignosulfonate alcalin ou alcalino-terreux, le reste étant constitué par des mouillants non ioniques ou anioniques tel qu'un alcoyl naphtalène sulfonate alcalin ou alcalino-terreux.

Par ailleurs, bien que cela ne soit pas indispensable, on peut ajouter d'autres adjuvants tels que des agents anti-mousse.

Le granulé selon l'invention peut être préparé par mélange des ingrédients nécessaires puis granulation selon plusieurs techniques en soi connues (drageoir, lit fluide, atomiseur, extrusion, etc...). On termine généralement par un concassage suivi d'un tamisage à la dimension de particule choisie dans les limites mentionnées ci-dessus. On peut encore utiliser des granulés obtenus comme précédemment puis imprégnés avec une composition contenant la matière active.

De préférence, il est obtenu par extrusion, en opérant comme indiqué dans les exemples ci-après.

Exemple GD1 : Granulés dispersibles

Dans un mélangeur, on mélange 90 % en poids de matière active et 10 % d'urée en perles. Le mélange est ensuite broyé dans un broyeur à broches. On obtient une poudre que l'on humidifie avec environ 8 % en poids d'eau. La poudre humide est extrudée dans une extrudeuse à rouleau perforé. On obtient un granulé qui est séché, puis concassé et tamisé, de façon à ne garder respectivement que les granulés d'une dimension comprise entre 150 et 2000 microns.

Exemple GD2 : Granulés dispersibles

Dans un mélangeur, on mélange les constituants suivants :

- | | |
|---|-----|
| - matière active | 75% |
| - agent mouillant (alkylnaphtalène sulfonate de sodium) | 2% |
| - agent dispersant (polynaphtalène sulfonate de sodium) | 8% |



- charge inerte insoluble dans l'eau (kaolin)

15%

Ce mélange est granulé en lit fluide, en présence d'eau, puis séché, concassé et tamisé de manière à obtenir des granulés de dimension comprise entre 0,15 et 0,80 mm.

5 Ces granulés peuvent être utilisés seuls, en solution ou dispersion dans de l'eau de manière à obtenir la dose cherchée. Ils peuvent aussi être utilisés pour préparer des associations avec d'autres matières actives, notamment antibactérien et antifongiques, ces dernières étant sous la forme de poudres mouillables, ou de granulés ou suspensions aqueuses.

10 En ce qui concerne les compositions adaptées au stockage et au transport, elles contiennent plus avantageusement de 0,5 à 95 % (en poids) de substance active.

L'invention concerne également un procédé pour le traitement antibactérien et antifongique thérapeutique pour l'homme ou l'animal par administration d'une dose efficace
15 du peptide selon l'invention, sous forme libre ou, le cas échéant, sous forme de sels d'addition avec un acide, de sels métalliques ou de sels d'addition avec une base pharmaceutiquement acceptables, à l'état pur ou sous forme d'une composition dans laquelle il est associé à tout autre produit pharmaceutiquement compatible, pouvant être
20 administrés par voie orale, parentérale, rectale ou topique.

Comme compositions solides pour administration orale peuvent être utilisés des comprimés, pilules, poudres (notamment dans des capsules de gélatine ou des cachets) ou granulés. Dans ces compositions, le produit actif selon l'invention est mélangé à un ou plusieurs diluants inertes, tels que amidon, cellulose, saccharose, lactose ou silice. Ces
25 compositions peuvent également comprendre des substances autres, par exemple un ou plusieurs lubrifiants tel que le stéarate de magnésium ou la talc, un colorant, un enrobage(dragées) ou un vernis.

Comme compositions liquides pour administration orale, on peut utiliser des solutions, des suspensions, des émulsions, des sirops, et des élixirs pharmaceutiquement
30 acceptable contenant des diluants inertes tels que l'eau, l'éthanol, le glycérol, les huiles végétales ou l'huile de paraffine. Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres, par exemple des produits mouillants, édulcorants, épaississants, aromatisants ou stabilisants..

Les compositions stériles pour administration parentérale peuvent être de
35 préférence des solutions aqueuses ou non aqueuses, des suspensions ou des émulsions. Comme solvant ou véhicule, on peut employer l'eau, le propylèneglycol, un polyéthylène glycol, des huiles végétales, en particulier l'huile d'olive, des esters organiques convenables. Ces compositions peuvent également contenir des adjuvants, en particulier



des agents mouillants, isotonisants, émulsifiants, dispersants et stabilisants. La stérilisation peut se faire de différentes façons, par exemple par filtration aseptisante, en incorporant à la composition des agents stérilisants, par irradiation ou par chauffage. Elles peuvent être également préparées sous forme de compositions solides stériles, qui peuvent être dissoutes au moment de l'emploi dans un milieu stérile injectable.

Les compositions pour administration rectale sont les suppositoires ou les capsules rectales, qui contiennent, outre le peptide actif, des excipients tels que le beurre de cacao, des glycérides semi-synthétiques ou des polyéthylène glycols.

Les compositions stériles pour administration topique peuvent être par exemple des crèmes, pommades, lotions, collyres, collutoires, gouttes nasales ou aérosols.

En thérapeutique humaine, le peptide selon l'invention est particulièrement utile dans les traitement antibactérien et antifongiques. Les doses dépendent de l'effet recherché et de la durée du traitement; elles sont généralement comprises entre 50 et 1000 mg par jour par voie orale pour un adulte en une ou plusieurs prises.

D'une façon générale, le médecin déterminera la posologie qu'il estime la plus appropriée en fonction de l'âge, du poids et de tous les autres facteurs propres au sujet à traiter.

Les exemples suivants sont donnés à titre non limitatif illustrent les compositions selon l'invention.

Exemple A:

On prépare, selon la technique habituelle, des comprimés dosés à 50 mg de peptide actif ayant la composition suivante:

| | |
|-------------------------|-------|
| - peptide thanatine | 50 mg |
| - amidon | 60 mg |
| - lactose | 50 mg |
| - stéarate de magnésium | 2 mg |

Exemple B:

On prépare une solution injectable contenant 20 mg de peptide actif ayant la composition suivante:

| | |
|---------------------|--------------------------|
| - peptide thanatine | 22,4 mg |
| - eau distillée | q.s.p. 2 cm ³ |

Par maladies fongiques, on entend les maladies causées par les champignons pathogènes) notamment ceux de la famille des fungi imperfecti en particulier les moniliales ou encore ceux de la famille des hyphocréales ou de celle des sphaeriales.



REVENDICATIONS

5

1. Peptide de formule:

10

a- Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys- b

dans laquelle:

15

- Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys est le maillon central, de taille réduite, qui comporte 2 résidus cystéines formant un pont disulfure intramoléculaire.

- a est un reste variable de séquence comprenant de 0 à 10 acides aminés,

- b est un reste variable de séquence comprenant de 0 à 5 acides aminés,

chaque groupe de trois lettres constitutif du maillon central et des groupes a et b étant le symbole à trois lettres d'un des 20 acides aminés de base.

20

2. Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que, dans la formule, lorsque a comprend au moins un acide aminé, celui-ci est l'un des 20 acides aminés de base et plus particulièrement choisi dans le groupe comprenant Gly, Ser, Lys, Pro et Val.

25

3. Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que, dans la formule, lorsque b comprend au moins un acide aminé, celui-ci est l'un des 20 acides aminés de base et plus particulièrement choisi dans le groupe comprenant Gln, Arg et Met.

30

4. Composition antibactérienne et/ou antifongique, caractérisé en ce qu'elle contient comme matière active un peptide selon l'une des revendications 1 à 3.

5. Composition antibactérienne et/ou antifongique selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est utilisable pour la protection des plantes.

35

6. Composition selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'elle est utilisable contre les champignons et bactéries pathogènes humains ou animaux.

7. Procédé de préparation du peptide selon l'une des revendications 1 à 3,



caractérisé en ce que, successivement:

- a) on fait agir sur des insectes hémiptères *Podisus sp* de préférence *maculiventris* au moins un inducteur bactérien de la synthèse biologique de la molécule;
 - b) on effectue l'extraction par mise en contact d'hémolymphes ou d'un broyat de
5 *Podisus* obtenues précédemment avec un milieu acide à neutre sous agitation, puis par centrifugation;
 - c) on fractionne le surnageant avec séparation par lavage des molécules hydrophiles et élution des molécules hydrophobes par des éléments appropriés, sur colonne séparatrice;
 - d) on purifie les extraits;
10 e) on effectue le séquençage.
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'on utilise comme inducteur 1:
15 bactérien une bactérie (Gram positif).
 9. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'on utilise comme inducteur 2. bactérien une bactérie (Gram négatif).
 10. Procédé de protection des plantes contre les maladies fongiques et bactériennes des
20 plantes, caractérisées en ce qu'on utilise un peptide selon l'une des revendications 1 à 3.



REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2733237

N° d'enregistrement
national

FA 513278
FR 9505094

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | Revendications concernées de la demande examinée |
|--|--|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | |
| A | BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 300, no. 2, 1 Juin 1994 LONDON, GB, pages 567-575, S. COCIANCICH ET AL. 'Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap-sucking bug Pyrrhocoris apterus' * page 574, colonne de gauche, alinéa 2 - alinéa 3; figures 2,4 * --- | 1,4-10 |
| A | EP-A-0 299 828 (PLANT GENETIC SYSTEMS NV) 18 Janvier 1989 * revendications; exemples * --- | 1,4-10 |
| A | FR-A-2 695 391 (CENTRE NAT RECH SCIENT) 11 Mars 1994 * revendications; exemples * --- | 1,4-10 |
| A | JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 46, 18 Novembre 1994 BALTIMORE, MD US, pages 28569-28575, K. CASTEEL-JOSSON ET AL. 'Acute Transcriptional Response of the Honeybee Peptide-Antibiotics Gene Repertoire and Required Post-translational Conversation of the Precursor Structures' * page 28573, colonne de droite, alinéa 1 - page 28575, colonne de gauche, dernier alinéa; figures 1,3 * ----- | 1,4-10 |
| | | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6) |
| | | C07K A61K A01N |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur |
| 14 Décembre 1995 | | Fuhr, C |
| <p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant</p> | | |

2

ZPO FORM 1503 01.92 (P&C/L)

